

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22620071152390

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

苯并(a)芘对褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)
肝细胞 DNA 交联与修复的影响初探

The effect of B(a)P on DNA cross-linking and repair in
Sebastiscus marmoratus liver cells

张景智

指导教师姓名: 陈荣 副教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

第一章 前言	1
1.1 B(A)P 的毒性作用研究进展	1
1.1.1 B(a)P 的代谢转化机制	1
1.1.2 B(a)P 的氧化损伤效应	2
1.1.3 B(a)P 的毒性作用	2
1.1.4 B(a)P 对鱼类的毒性作用	3
1.2 DNA 交联的研究进展	6
1.2.1 DNA-DNA 交联的研究进展	6
1.2.2 DNA-蛋白质交联的研究进展	7
1.3 本研究的目 的及主要内容	12
第二章 材料和分析方法	13
2.1 实验材料	13
2.2 实验试剂	13
2.3 实验仪器	14
2.4 实验方案	14
2.4.1 实验动物及饲养条件	14
2.4.2 染毒条件	14
2.4.3 实验内容	15
2.5 鱼体胆汁内苯并芘及其代谢产物的测定	15
2.5.1 前处理	15
2.5.2 样品测定	16
2.6 B(A)P 对褐菖鲉肝细胞 DNA 的交联效应	16
2.6.1 DNA-DNA 交联 (DDC) 的测定	16
2.6.2 DNA-蛋白质交联 (DPC) 的检测	18
2.7 鱼肝脏细胞与 DNA 交联的蛋白质的定量测定	20

2.7.1 分离细胞核.....	20
2.7.2 细胞核提取制备.....	20
2.7.3 前处理及测定.....	20
2.8 鱼肝脏细胞的氧化损伤	21
2.8.1 鱼肝脏细胞蛋白质羰基含量测定.....	21
2.8.2 鱼肝脏细胞总抗氧化能力测定.....	22
2.9 数据处理	22
第三章 结果	23
3.1 鱼体胆汁内苯并芘及其代谢产物的测定	23
3.2 B(A)P 对褐菖鲉肝细胞 DNA 的交联与修复效应	24
3.2.1 小牛胸腺 DNA 浓度标准曲线.....	24
3.2.2 B(a)P 对褐菖鲉肝细胞 DNA-DNA 交联和修复效应.....	25
3.2.3 B(a)P 对褐菖鲉肝细胞 DNA-蛋白质交联和修复效应	26
3.2.4 B(a)P 对褐菖鲉 DDC 和 DPC 交互作用和相关性分析	27
3.2.5 B(a)P 对褐菖鲉 DNA-DNA 交联修复和 DNA-蛋白质交联修复的相关性分析.....	28
3.3 B(A)P 对褐菖鲉肝细胞与 DNA 交联的蛋白质定量分析	29
3.4 B(A)P 对褐菖鲉肝细胞的氧化损伤效应.....	32
3.4.1 蛋白质羰基 (PCO) 测定.....	32
3.4.2 总抗氧化能力 (T-AOC) 测定.....	34
第四章 讨论	36
4.1 鱼体胆汁内苯并芘及其代谢产物的测定	36
4.2 B(A)P 对褐菖鲉肝细胞的氧化损伤	37
4.3 B(A)P 在第 1-7d 对褐菖鲉 DNA 交联的影响.....	38
4.3.1 B(a)P 在第 1-7d 对褐菖鲉 DNA-DNA 交联 (DDC) 的影响.....	39
4.3.2 B(a)P 在第 1-7d 对褐菖鲉 DNA-蛋白质交联 (DPC) 的影响	39
4.3.3 B(a)P 在第 1-7d 对褐菖鲉 DDC 和 DPC 交互作用和相关性分析.....	41
4.4 褐菖鲉肝细胞 DNA 交联的恢复	42

4.5 鱼肝脏细胞与 DNA 交联的蛋白质的定量测定	46
第五章 结论与展望	47
5.1 结论	47
5.2 本研究的特点和贡献	47
5.3 展望	48
参考文献	49
致 谢	61

Table of Contents

Chapter 1 Introduction	1
1.1 The review of research on the toxicity of B(a)P	1
1.1.1 The mechanism of metabolic conversion of B(a)P	1
1.1.2 The oxidation damage of B(a)P	2
1.1.3 The toxicity of B(a)P	3
1.1.4 The toxicity of B(a)P to fish	3
1.2 The review of research on the DNA cross-linking	6
1.2.1 The review of research on the DNA-DNA cross-linking	6
1.2.2 The review of research on the DNA-protein cross-linking	7
1.3 The purpose and content of research	12
Chapter2 Materials and Methods	13
2.1 Materials	13
2.2 Reagents	13
2.3 Instruments	14
2.4 Design of Experiments	14
2.4.1 Experimental animal and feeding condition	14
2.4.2 Conditions of B(a)P injection	14
2.4.3 The content of experiment	15
2.5 The determination of B(a)P and its catabolin in bile	15
2.5.1 Pre-treatment	15
2.5.2 The determination of sample	16
2.6 The effect of B(a)P on DDC in the liver cells of <i>Sebastiscus marmoratus</i>	16
2.6.1 The determination of DNA-DNA cross-linking	16
2.6.2 The determination of DNA-protein cross-linking	18
2.7 The protein cross-linking of DNA determination in the liver of fish	20
2.7.1 The separation of nuclear	20

2.7.2 The preparation of nuclear extract	20
2.7.3 The pre-treatment and determination	20
2.8 The oxidative damage in the liver of fish	21
2.8.1 The determination of PCO	21
2.8.2 The determination of T-AOC	22
2.9 Data processing and analysis	22
Chapter 3 Results	23
3.1 The determination of B(a)P and its metabolites in the bile of fish	23
3.2 The effect of B(a)P on DNA-crosslinking and repair in the liver cells of Sebastiscus marmoratus	24
3.2.1 The concentration of calf thymus DNA standard curve	24
3.2.2 The effect of B(a)P on DDC and repair in the liver cells of Sebastoscis marmoratus	25
3.2.3 The effect of B(a)P on DPC and repair in the liver cells of Sebastoscis marmoratus	26
3.2.4 The interaction and correlation analysis of DPC on DDC and DPC in the liver cells of Sebastoscis marmoratus	27
3.2.5 The correlation analysis of DPC and DDC repair	28
3.3 The protein cross-linking of DNA determination in the liver cells of Sebastiscus marmoratus	29
3.4 The oxidative damage in the liver cells of Sebastiscus marmoratus	32
3.4.1 The determination of PCO	32
3.4.2 The determination of T-AOC	34
Chapter 4 Discussion	36
4.1 The determination of B(a)P and its metabolites in the bile of fish	36
4.2 The oxidative damage in the liver cells of Sebastiscus marmoratus	37
4.3 The effect of B(a)P on the DNA cross-linking in liver cells of Sebastiscus marmoratus(1-7d)	38
4.3.1 The effect of B(a)P on the DDC in the liver cells of Sebastiscus marmoratus	

(1-7d)	39
4.3.2 The effect of B(a)P on the DPC in the liver cells of <i>Sebastiscus marmoratus</i> (1-7d)	39
4.3.3 The interaction and correlation analysis of DDC and DPC in the liver cells of <i>Sebastiscus marmoratus</i> (1-7d).....	41
4.4 The DNA cross-linking repair in the liver cells of <i>Sebastiscus marmoratus</i>	42
4.5 The protein cross-linking of DNA determination in the liver cells of <i>Sebastiscus marmoratus</i>	46
Chapter 5 Conclusions and prospects	47
5.1 Conclusions	47
5.2 Research characteristics and contributions	47
5.3 Prospects.....	48
References	49
Acknowledgements	61

摘要

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是海洋环境中最常见、危害最为严重的有机污染物之一。苯并 (a) 芘 [benzo(a)pyrene, B(a)P] 是典型的多环芳烃, 也是其中致癌性最强的种类。本文以海洋鱼类褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) 为实验动物, 苯并芘 [B(a)P] 为污染物, 应用生态毒理学方法按照 0.05 mg/kg (低浓度组)、0.50 mg/kg (中浓度组)、5.00 mg/kg (高浓度组) 的浓度梯度进行注射染毒, 第 0、3、6 d 注射, 7 d 后进行一周的恢复实验, 在第一次注射后的第 1、4、7、8、10、14 d 分别取样。利用荧光光密度法对鱼胆汁内苯并芘及其代谢产物的蓄积量进行测定; 利用 2, 4-二硝基苯肼法 (DNPH) 测定蛋白质羰基 (PCO) 含量; 利用总抗氧化能力试剂盒测定鱼体肝脏总抗氧化能力 (T-AOC); 采用荧光检测法检测 B(a)P 染毒后褐菖鲉肝细胞 DNA-DNA 交联 (DDC), 并用 KCl-SDS 沉淀法检测 DNA-蛋白质 (DPC) 交联; 采用 DNAzol-strip 方法测定与 DNA 交联的蛋白含量。上述结果的分析表明:

经注射染毒后褐菖鲉胆汁内的苯并芘及其代谢产物蓄积量、PCO 含量、T-AOC 与染毒时间和染毒浓度均呈正相关, 存在着明显的剂量效应和时间效应关系。第 1, 4, 7d 各染毒组鱼体胆汁内苯并芘及其代谢产物的蓄积量与对照组相比均有极显著增加。而第 8、10、14d 各染毒组鱼体胆汁内苯并芘及其代谢产物的蓄积量与第 7 天相应浓度组对比均有极显著降低。

各染毒组 DNA-DNA 交联 (DDC)、DNA-蛋白质 (DPC) 交联与对照组相比均有显著增加, 且 DNA 交联效应与染毒剂量之间有剂量效应关系; 各染毒组随染毒时间的变化与 DNA 交联变化并不明显, 第 4 d 稍有降低, 第 7 d 略有升高。DDC 在第 8 d 达到最高值, DPC 在第 7 d 达到最高值, DDC 和 DPC 均在第 8 d 到第 10 d 迅速下降, DDC 在第 10 d 到第 14 d 变化不明显, 而 DPC 则持续降低。交联蛋白含量与 PCO、T-AOC 呈极显著相关, 与 DPC 的变化趋势相似, 并有极显著的相关性。

对上述指标进行综合分析, 本文认为: 第一, 蛋白羰基 (PCO) 对 DDC 和 DPC 的影响都极显著 ($P < 0.001$), 但是总抗氧化能力 (T-AOC) 对 DDC 的影响大于对 DPC 的影响。第二, DDC 由于更易于修复, 受总抗氧化能力影响极显著,

导致了染毒效果有滞后性，DPC 的染毒滞后性则不明显。第三，DPC 的修复相对 DDC 来说，在连续染毒第 7 天后出现的时间比较早，在第 7 天到第 8 天出现了修复高峰期，DPC 系数降低的最快。DPC 的修复相对 DDC 来说，更具有延续性，三个浓度组在第 10 天到第 14 天的过程中，有相对比较快的修复速度。第四，DPC 的修复相对 DDC 来说修复更加困难，但更加彻底，中低浓度组都修复到了对照组的水平，高浓度组修复到了比对照组还低的水平。第五，在检测 DPC 中的 DNAzol 方法中，与 DNA 交联的蛋白含量与 DPC 呈极显著相关，表明了新方法有一定的可行性。

关键词：苯并（a）芘；褐菖鲉； DNA-DNA 交联； DNA-蛋白质交联；

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs), as the most common toxic organic pollutants in ocean, do great harm to marine organisms. Extensive data exist to confirm that Benzo[a]pyrene[B(a)P] is toxic to marine organisms, as a typical member of the PAHs family. *Sebastiscus marmoratus* have been injected with three doses of B(a)P (0.05 mg/kg, 0.50 mg/kg, 5.00 mg/kg) each two days, sampled in 1st, 4th and 7th day, then stopped injecting, and sampled in 8th, 10th and 14th day. The contents of B(a)P and its metabolites in bile were determined by fluorodensitometry, the fish liver T-AOC was determined by T-AOC reagent kits, and the contents of DDC and DPC in *Sebastiscus marmoratus* liver were determined by fluorescence spectrophotometer and KCl-SDS assay respectively; DNA cross-linking of the protein content was determined by DNAzol -strip method. The results showed that:

The content of B(a)P and its metabolites revealed significant dose and time-dependent increasing.

B(a)P in the exposure on 1st day to 7th day cause DDC, DPC, PCO content increased, the decline in total antioxidant capacity, reflecting the increase of crosslinking degree; the 8th day as DNA repair, DPC, PCO content started to decline, total antioxidant capacity began to increase, reflecting the decline in cross-linking degree. So, with the pollutants in time, showing a good dose and time effect.

Using fluorescence detection and the KCl-SDS precipitation determined the content of DDC and DPC. The result showed that: after *Sebastiscus marmoratus* exposed to B(a)P 1st, 4th and 7th day, all of the exposed group DDC, DPC compared with the control group were significantly increased, and the DNA cross-linking between effect and dose had significantly dose-response relationship. When the exposure time changed, the DNA cross-linking did not change significantly: The 4th day slightly lower, the 7th day increased slightly. DDC in the highest value on 8th day, DPC in the highest value on 7th day, DDC and DPC on 8th day to 10th day decreased rapidly, DDC in the 10th

day to 14th day did not change significantly, while the DPC will continue to lower. The protein of DNA cross-linking was significantly related to PCO, T-AOC and DPC.

Comprehensive analysis of these indicators, this paper argues: First, PCO on the impact of DDC and DPC are very significant, but the impact of DDC on T-AOC is more than DPC. Second, DDC was easier repaired, and the impact on T-AOC was significant, so it resulted in a lag effect of the exposure, DPC's exposure lag was not significant. Third, DPC repair in the continuous exposure time was earlier than DDC. there was a peak of reducing speed in the 7th day to 8th day, but DPC's reducing speed decreased the fastest. DPC's repair had a more time. Fourth, DPC is relatively more difficult to repair, but more thorough. Fifth, in the detection of the protein of DNA cross-linking in the DNazol method, the protein of DNA cross-linking was significantly related to DPC, indicating that the new method is certainly feasible.

Keywords: B(a)P; *Sebastiscus marmoratus*; DNA-DNA cross-linking; DNA-protein cross-linking;

第一章 前言

多环芳烃（Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs）是海洋环境中最常见、危害最为严重的有机污染物之一。多环芳烃是最早发现且数量最多的致癌物，目前已经发现的致癌性多环芳烃及其衍生物超过400种，每年排放到大气中的多环芳烃有几十万吨（杨发忠等，2005）。苯并（a）芘[benzo(a)pyrene, B(a)P]是典型的多环芳烃，也是其中致癌性最强的种类。

1.1 B(a)P 的毒性作用研究进展

1.1.1 B(a)P 的代谢转化机制

近年来，通过对B(a)P在动物体内的代谢过程及其致毒机理的研究，发现B(a)P的生物转化分成I相和II相反应，I相反应包括氧化和水解反应，II相反应主要是I相中间产物的结合反应，形成更具亲水性的化合物。

在I相反应中，外源性物质如PAHs等被各种代谢酶转化，这些酶中最重要的就是细胞色素P450依赖性单加氧化酶，它们和还原型辅酶II—细胞色素P450还原酶、细胞色素b-5依赖性单加氧酶、还原型辅酶I以及环氧化物水解酶一起参与外源性物质的催化氧化反应。细胞色素被分为族系和亚族系，在这些族系中CYP1A, 1A2, 1B1和3A4被认为涉及PAHs的代谢转化，尤其是CYP1A被认为是最有效氧化代谢PAHs的酶系（Guengerich, 1992）。

CYP1A与环氧化物水解酶、P450过氧化物酶和脱氢酶一起催化活化B(a)P产生不同的代谢产物，其中形成的苯并（a）芘-7, 8-环氧化物经水解反应形成近致癌物苯并（a）芘二氢二醇，在继续代谢转化形成终致癌物苯并（a）芘-7, 8-二氢二醇-9, 10-环氧化物（Conney, 1982）。因此，水解反应在致癌物活化过程中有重要意义。在水解过程中也有多种苯并（a）芘环氧化物异构体，除7, 8-环氧化物外，还有2, 3-环氧化物，4, 5-环氧化物，9, 10-环氧化物，它们进一步形成的二氢二醇和酚类化合物不具有致癌性，这些环氧化物在二氢二醇脱氢酶和过氧化物酶的催化下被进一步代谢成醌和带一个电荷的阳离子（Conney, 1982; Frueh, 2001）。

B(a)P进入生物体I相反应生成的中间代谢产物可被结合生成极性较强的水溶性物质，容易被排除体外。其中二氢二醇类和酚类在葡萄糖醛酸基转移酶和磺基转移酶的催化下结合成尿苷二磷酸葡萄糖醛酸和硫酸酯。环氧化物、二醇环氧化物和醌类被谷胱甘肽硫转移酶（GST）催化与谷胱甘肽结合产生谷胱甘肽结合物。

1.1.2 B(a)P 的氧化损伤效应

生物有机体在新陈代谢过程中可以产生自由基，其中最主要的为氧自由基（Oxygen Free Radical），包括超氧阴离子（ O_2^- ）、氢过氧基（ HO_2 ）、过氧化氢（ H_2O_2 ）、羟自由基（ $\cdot OH$ ）、氧有机自由基（ $RO\cdot$ ）、有机过氧基（ $ROO\cdot$ ）、活性氧（ROS）等，占机体内自由基的95%以上，而且氧自由基往往也是其他自由基生成的起因（Buchet, 1990）。生物体内有产生氧自由基的系统，但也有清除氧自由基或自由基防御的系统。研究表明，动物体内的自由基防御系统包括非酶系统与酶系统，正常生命机体内氧自由基的产生和清除处于动态平衡状态（海春旭, 2007），自由基在体内不断产生也不断被清除，并不显示对机体的有害作用。在病理情况下，自由基代谢紊乱，无论是自由基产量增加还是清除自由基的能力减弱或兼而有之，其结果是自由基过剩，活性氧增多。

B(a)P在体内代谢活化过程中能够产生活性氧，引起机体氧化应激和脂质过氧化损伤。Pacheco等（2002）的研究表明B(a)P会在欧洲鳗鲡（*Anguilla anguilla*）胆汁内蓄积，并可造成肝脏细胞的萎缩、组织坏死以及点状炎症。翁朝红等（2008）和 Ribeiro等（2005）也分别发现B(a)P可以引起黑鲷（*Sparus macrocephalus*）和欧洲鳗鲡肝组织的病理变化。活性氧的毒性作用可以表现在以下三个方面：一是破坏细胞的生物膜系统。二是损害蛋白质和酶系统，引起蛋白质分子发生聚合、肽键断裂等，特别是可以影响与生命活动关系密切的一些重要酶的活性如SOD、GSH-Px等。三是损伤核酸和染色体。自由基可以直接作用于核酸分子，通过碱基修饰作用影响DNA的功能，也可造成核酸的断裂，造成染色体的变异等。另外，B(a)P引起的氧化损伤对生精过程、生殖细胞DNA损伤、生精细胞凋亡及坏死具有重要作用。

1.1.3 B(a)P 的毒性作用

B(a)P是一种具有强致癌性的多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbons,

PAHs),被国际癌症研究机构(IARC)列为第二类A组人类致癌物(刘美霞,2006)。PAH类致癌物代谢途径有两条(De等,2000):①经加单氧酶CYP催化形成环氧化物,然后由mEH水解成双羟基酮、苯酚,再经UGT、硫基转移酶催化,与葡萄糖醛酸、硫酸结合而降解。其代谢中间产物如双羟基环氧化衍生物苯并芘7,8双羟基酮9,10环氧化物为强DNA加成物。②通过氧自由基作用形成苯并芘3,6苯并芘酮,苯并芘1,6酮、苯并芘6,12酮(均为致突变剂)。

B(a)P被认为是高活性致癌剂,最终致癌物有四种异构体,其中的(+)-BP-7 β ,8 α -二醇体-9 α ,10 α -环氧化物-苯并(a)芘,已证明致癌性最强,它与DNA形成共价键结合,造成DNA损伤,如果DNA不能修复或修而不复,细胞就可能发生癌变。其他三种异构体也有致癌作用。动物实验包括经口、经皮、吸入、经腹膜皮下注射,B(a)P对局部或全身都有致癌作用。许多研究采用不同的实验动物和多种给药途径,都证实B(a)P代谢活化可以诱发癌症(陈学敏等,2001)。

B(a)P具有较强的致突变性。有研究检测B(a)P致突变性采用Ames试验和微核试验,结果发现:B(a)P可以使仓鼠卵巢细胞株的突变率和小鼠骨髓细胞微核率增加(Yoo,2005)。

目前对B(a)P的生殖毒性缺乏系统研究,其作用机制尚不十分清楚。一般认为,B(a)P雄性生殖毒性与芳香烃受体(AhR)活化、精子损伤、I相代谢酶诱导、脂质过氧化,DNA加合物形成及生殖细胞凋亡有关(Ciolino,1998)。B(a)P在体内进行生物转化时,可形成多种中间产物,其中许多中间产物可通过氧化还原反应,产生大量的活性氧物质,进而引起机体的氧化应激。有研究表明,认为B(a)P也可以协同氧化生成6-OH-B(a)P,经过自由基形式所生成混合醌类衍生物可以通过B(a)P醌型/B(a)P氢醌的氧化还原过程在细胞内还原酶作用下产生活性氧。B(a)P可经I相代谢酶代谢,增加活性氧产生,导致脂质过氧化损伤,DNA氧化损伤和其它病理改变(Lopes,1998;Park,1996)。

1.1.4 B(a)P 对鱼类的毒性作用

1.1.4.1 B(a)P 对鱼类抗氧化系统的影响

近年来,通过对B(a)P在动物体内的代谢过程及其致毒机理的研究,发现B(a)P在动物体内进行生物转化时,B(a)P在代谢过程中会形成多种活性极高的亲电中间

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库